

PROPRIETĂȚILE CELULELOR STEM SPERMATOGONIALE ÎN MEDIUL NIȘELOR FIZIOLOGICE ȘI METABOLICE TESTICULARE

**Balan Ion^{1,2}, Gavojdian Dinu³, Budevici Alexandr⁴, Roșca Nicolae¹,
Buzan Vladimir¹, Balacci Sergiu¹, Osipciuc Galina⁵, Furdui Vlada¹,
Harea Vasile¹, Cretu Roman¹, Bacu Gheorghe¹,
Țurcanu Parascovia¹, Temciuc Vlad¹, Filippov Artiom¹**

¹*Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie, Universitatea de Stat din
Moldova, Chișinău, Republica Moldova, balanion@rambler.ru*

²*Universitatea Tehnică a Moldovei, Chișinău, Republica Moldova*

³*Institutul de Cercetare și Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor,
Balotești, Romania*

⁴*Republican Unitary Enterprise „The Scientific and Practical Center of
the National Academy of Sciences of Belarus for Animal Husbandry*

⁵*Institutul Științifico-Practic de Biotehnologii în Zootehnie și Medicină
Veterinară, Maximovca, r-l Anenii Noi, Republica Moldova*

Abstract. Spermatogenesis is a continuous process, maintained by the self-renewal and differentiation of spermatogonial stem cells (SSC), which arise from undifferentiated precursors (gonocytes) in the physiological conditions of the testicular cell niche. SSC serve as the foundation for the physiology of continuous spermatogenesis, they have the ability to self-renew by differentiation to produce spermatozoa suitable for fertilization, therefore the knowledge of the regulatory processes of SSC is of great importance for understanding the fundamental molecular mechanisms of the function of these cells in spermatogenesis. By strict physiological regulation, spermatogonial transitions occur with a complete non-exploitation of equivalent changes in metabolism, a conserved overregulation of mitochondrial function, biogenesis and oxidative phosphorylation in spermatogony differentiation, as well as the relationship between metabolism and the external microenvironment. In the present paper we have tried to review the current state of research in CSS physiology and biology, as well as their molecular regulation, in the physiological and metabolic niches, necessary for fundamental investigations and possible practical applications. Elucidation of the exact mechanisms and characteristics of testicular maturation events and gonocyte transition to SSC by activation of CSS-specific pathways or early embryonic establishment of transcriptional profiling of neonatal and prepubertal spermatogonia will contribute to new achievements of biological,

physiological and metabolic aspects of SSC. Increased knowledge regarding the biology, physiology and metabolism of SSC will improve our understanding of the possibilities of applying SSC tools and manipulations in the evolution of spermatogenesis mechanisms.

Key words. *Spermatogonial stem cells, spermatogenesis, microenvironment.*

Introducere

Potențialul celulelor stem se află la baza dezvoltării tuturor țesuturilor și are un rol primordial în evoluția și formarea celulelor diferențiate în anumite organe. Menținerea fiziologiei țesuturilor și organelor se realizează prin reînnoirea continuă a celulelor stem, care este capabilă să producă diferențieri într-un mod nelimitat. Prin diferențieri în procesul de spermatogeneză celulele stem spermatogoniale (CSS) transmit informația genetică descendenților. Spermatogeneza este un proces extrem de complex, care menține producția de celule reproductive pe toată durata vieții mamiferelor și este controlată cu precizie de expresia factorilor intrin- și extrinseci. Derularea spermatogenezei depinde de proliferarea și diferențierea continuă a CSS [8, 18], care reprezintă spermatogonii nediferențiate ce mențin potențialul de auto-reînnoire, diferențiere și evoluarea spermatogenezei [16]. Deși, reînnoirea are loc prin diviziunea celulară continuă pe tot parcursul vieții organismului, modul în care celulele germinale își mențin activitatea de reînnoire puțin este elucidat. Prin urmare, CSS situate pe membrana bazală a tubilor seminiferi ai testiculului au capacitatea de a se reînnoi pe parcursul menținerii populațiilor stabile și diferențierii în celule spermatogene la diferite stadii de dezvoltare în procesul de formare a spermatozoizilor [8, 20]. CSS sunt fundamentul spermatogenezei și fertilității masculine, iar această temelie se menține prin replicarea fiziologică a acestora de dimensiuni normale și prin producerea numerică suficientă de spermatogonii progenitoare diferențiate pentru a asigura dezvoltarea continuă a spermatozoizilor [8]. CSS, ca și în cazul tuturor celulelor stem specifice țesuturilor, se află într-un mediu fiziologic special sau într-o nișă, constituită din celule somatice testiculare și celulele mioide peritubulare [5, 26], care secretă numeroși factori de creștere și citokine, ce reglează replicarea și diferențierea CSS. Nișa fiziologică a CSS este considerată o nișă deschisă, care nu poate fi definită anatomic cu precizie și își schimbă natura pe parcursul ciclului epitelial seminifer, datorită fluctuațiilor ciclice ale expresiei regulatorilor paracrin. Această nișă este definită de fenomene moleculare, dar nu

anatomice, iar fiziologia micromediului, care asigură reînnoirea CSS și declanșarea diferențierii în celule spermatogene la toate nivelurile, constituie criteriile fiziologice minime pentru o nișă CSS [27]. În aceste condiții, spermatogoniile nediferențiate suferă o serie de diviziuni celulare pentru a forma spermatogonii diferențiate, iar CSS sunt definite prin capacitatea lor de auto-reînnoire sub influența anumitor factori. Primul factor de creștere demonstrat a fi esențial pentru funcționarea fiziologică a nișei CSS este factorul neurotrofic, derivat din linia celulară glială [23]. Mai mult, sub influența acestui factor, bine definit, divizarea CSS poate fi extinsă în esență la infinit, păstrând în același timp capacitatea de reînnoire și capacitatea de a da naștere la colonii spermatogene pe termen lung. Dacă, diviziunea CSS este un proces simetric sau asimetric la mamifere, indiferent de căile de diviziune, CSS suferă, fie auto-reînnoire, pentru a menține un număr suficient de CSS, fie diferențiere în spermatogonii, pregătiți pentru diferențierea spermatogenă. În timp ce modelele tradiționale propun, că capacitatea celulelor stem este limitată la spermatogonii [21], majoritatea datelor actuale susțin un model dinamic de CSS, în care soarta celulelor spermatogoniale poartă caracter variabil [3]. Evaluarea efectului unui număr de molecule candidate asupra fiziologiei spermatogoniilor a constatat, că majoritatea dintre aceste celule au caracteristici asemănătoare progenitoarelor, iar cele cu statut de auto-reînnoire sunt minoritare [19]. Acest lucru se datorează faptului, că CSS sunt depășite numeric de diferențierea spermatogoniilor, spermatocitelor, spermatidelor și spermatozoizilor pe care le produc și sunt definite, ca toate celelalte celule stem, prin capacitatea lor de a echilibra procesele de auto-reînnoire și diferențiere. Acest echilibru fiziologic menține volumul de CSS și satisface cererea proliferativă a testiculelor de a produce zilnic milioane de spermatozoizi, inclusiv și la transplantul lor, ceea ce deschide noi căi de utilizare a CSS pentru biomedicină și agricultură, cum sunt animalele modificate genetic, conservarea resurselor genetice și, în ansamblu, a biodiversității și combaterea infertilității masculine. În ultimile decenii, transplantul celulelor stem spermatogoniale a fost încercat la diferite specii de animale, inclusiv porci, bovine, caprine, ovine, maimuțe, canine și camelide. În mod semnificativ, CSS au un potențial extraordinar benefic și, în același timp, un obstacol major în tehnologia de reproducere asistată, fiind puține la număr și dificil de a fi identificate și izolate. În acest context, apare speranța, că această scurtă informație rezumată va

putea contribui la continuarea cercetărilor asupra detaliilor fiziologice ale CSS.

Nișele testiculare ale celulelor stem spermatogonale

CSS se dezvoltă din gonocite în testiculul postnatal, care apar din celulele germinale primordiale (CGP) în timpul dezvoltării fetale. CGP iau naștere din amniosul dorsal la debutul gastrulației [29] și sunt o populație de celule tranzitorie, care apare inițial într-un grup mic de celule alcaline pozitive pentru fosfatază în embrion după specificarea lor din ectodermul extraembrionar [36]. CGP proliferază în mod activ și migrează către gonada în curs de dezvoltare [5, 32], unde vor ocupa creasta genitală și vor suferi determinarea sexului prin intrarea în căile de dezvoltare specifice sexului masculin sau feminin [20]. În timpul formării alantoidei, CGP sunt îndepărtate pasiv din embrion, înainte de a începe migrarea către gonada indiferentă, se reproduc și colonizează crestele genitale. Semnalele externe din mediul somatic determină sexul CGP [25] și, concomitent, cu dezvoltarea celulelor germinale masculine, CGP infiltrează tubii seminiferi ai testiculelor și sunt denumite gonocite [7], care devin închise în cordoane testiculare formate din celulele precursorare Sertoli și celulele mioide peritubulare. Gonocitele ulterior interacționează cu celulele din nișa fiziologică a CSS pentru a deveni spermatogonii [24], care colonizează membrana bazală și inițiază prima rundă de spermatogeneză, precum și stabilesc grupul primordial de CSS, care mențin spermatogeneza pe tot parcursul vieții postpuberale [39]. Nișa fiziologică, la rândul său, este constituită din două compartimente distincte structural, tubul seminifer și țesutul interstițial [28] și reglează homeostazia testiculară prin echilibrarea reînnoirii și diferențierii CSS. O nișă de CSS este formată din celule, componente ale matricei extracelulare și factori locali, solubili și prezenți în vecinătatea acestei celule, care și reglează activitatea nișei. Baza structurală pentru nișa CSS este compartimentul bazal al tubilor seminiferi, care este compus din celule Sertoli și celule mioide peritubulare [8]. Celulele Sertoli și celulele mioide peritubulare secretă componentele membranei bazale la care CSS sunt conectate prin molecule de adeziune. Celulele Sertoli sunt celule epiteliale polarizate în formă de coloane, care susțin CSS și diferențierea celulelor germinale prin furnizarea de nutrienți și medierea semnalelor externe pentru a menține spermatogeneza [10]. În interiorul tubului seminifer, celulele Sertoli, prin joncțiuni strânse, formează bariera hematotesticulară, care împarte epiteliul seminifer în compartimentele

bazale și luminale și joacă un rol important în reglarea diferențierii celulelor germinale [5]. Bariera hematotesticulară menține un flux selectiv al compușilor între lichidul luminal, plasma sangvină și lichidul interstițial, asigurând un mediu imunitar pentru celulele germinale haploide din compartimentul luminal al tubilor seminiferi, unde sunt localizate CSS în zone adiacente spațiului interstițial. Spermatogoniile nediferențiate se află în zonele tubulare adiacente sistemului vascular [39]. Spermatogoniile se dezvoltă pe suprafața membranei bazale și în continuare evoluează în trei tipuri de celule: spermatogonii nediferențiate, spermatogonii în diferențiere activă și spermatogonii diferențiate [6]. Celulele Sertoli stimulează populația de celule germinale din testicule și sunt esențiale pentru menținerea fiziologică a spermatogenezei prin asigurarea matricei celulare și secreția unor factori de creștere specifici [10], iar nișa fiziologică a CSS, în ansamblu, mediază semnalele endocrine și paracrine, care reglează auto-reînnoirea și diferențierea. Țesutul interstițial reprezintă diferite tipuri de celule, care includ celule mezenchimale, fibre nervoase, țesuturi conjunctive și celulele Leydig, care secretă hormonul testosteron și citokine, acționând direct sau indirect reglarea de auto-reînnoire a CSS [28, 40].

Linia ciclului spermatogen a celulelor stem spermatogoniale

Dezvoltarea ciclului spermatogen se produce potrivit liniei spermatogene, care reprezintă un proces stabil, împărțit în etape variabile, în funcție de particularitățile celulare specifice ale speciei. Pentru clarificarea reglării CSS este important să descifrăm esența liniei spermatogene pe care o produc. Inițial pe baza morfologiei nucleare au fost descrise trei tipuri de spermatogonii, care reprezintă celule germinale diploide primitive, situate pe membrana bazală a tubilor seminiferi [6]. Prin absența în nucleu a heterocromatinei, o caracteristică generală a celulelor nediferențiate, spermatogoniile de tip A au fost considerate cele mai primitive. Nucleii spermatogonilor de tip intermediar conțin o cantitate mică de heterocromatină, iar spermatogoniile de tip B, conțin o cantitate mare de heterocromatină, indicând o stare mai diferențiată. Aici, investigațiile histologice a țesuturilor tubilor seminiferi au oferit un nivel suplimentar de detalii referitor la morfometria spermatogonială, comparativ cu secționarea țesuturilor testiculare integre. Pe baza examinării secțiunilor transversale și longitudinale a tubilor seminiferi, Huckins și Oakberg [16, 27] au stabilit, că spermatogoniile de tip A nediferențiate pot fi subdivizate în trei tipuri de spermatogonii, care se

deosebesc doar prin dislocarea lor topografică pe membrana bazală a tubului seminifer. Divizarea unui tip de spermatogonii duce la divizarea consecutivă a altor tipuri, care completează citokineza, pentru a produce prin auto-reînnoire, două noi spermatogonii, care rămân conectate printr-o punte citoplasmatică intercelulară și produce un lanț de patru spermatogonii la următoarea diviziune diferențiată. Diviziunile celulare ulterioare duc la formarea de lanțuri de 8, 16 și uneori 32 spermatogonii, iar lanțurile de 4-16 spermatogonii sunt, în general, considerate implicate în procesul de diferențiere și, astfel, grupul de CSS include, cel puțin, două tipuri de spermatogonii. Unii autori au susținut că potențialul CSS se poate extinde la clone mai mari [39], dar acest lucru rămâne abstract. Totodată, în timp ce fiecare clonă poate fi observată în secțiuni histologice ale tubilor seminiferi, dimensiunea clonei poate fi observată numai în preparatele întregi ale testiculelor. Pe de altă parte, spre deosebire de spermatogoniile nediferențiate, spermatogoniile de diferențiere, sunt distribuite uniform de-a lungul epiteliului seminifer și se divid în mod sincronizat și se află în stadii specifice ale epiteliului seminifer [27]. În același timp, spermatogoniile de tip B evoluează în spermatocite primare, care progresează în meioză. Două diviziuni meiotice duc la formarea spermatocitelor secundare și, respectiv, a spermatidelor haploide, care suportă 16 etape de modificări morfologice pentru a deveni în final spermatozoizi morfologic și fiziologic apti de a fi eliberați din epiteliul seminifer [27]. O alternativă a modelului menționat de auto-reînnoire a CSS este un model sincron „zero” [6], unde spermatogoniile sunt prezente ca celule unice sau perechi la toate etapele din epiteliul seminifer, fără mitoze și au fost considerate „celule stem de rezervă”, celule care nu contribuie la echilibrul spermatogenezei. CSS de rezervă, evaluate sincron, sunt activate numai în cazul când spermatogeneza este deteriorată prin diversitatea factorilor destructivi. Această dezvoltare spermatogenă sincronizată poate fi facilitată de citokineza incompletă în timpul diviziunilor mitotice, care mențin punțile citoplasmatică între celulele germinale și care pot contribui la coordonarea dezvoltării sincronizate a clonelor de celule germinale [2]. Fiecare etapă este caracterizată și cronometrată de o combinație de tipuri de spermatogonii, spermatocite și spermatide, care parcurg sincron procesul spermatogen.

Metabolismul celulelor stem spermatogoniale

Nișă fiziologică de CSS este, în general, caracterizată printr-o combinație de interacțiuni celulare specifice, matricea extracelulară și factorii de creștere, într-un anumit mediu metabolic, specific pentru CSS, o nișă metabolică. Datele literaturii demonstrează, că această reglare metabolică este esențială pentru menținerea viabilității CSS [17, 13]. Cu toate acestea, pe lângă cunoscuta metabolismului celular și fenotipul metabolic al majorității celulelor din nișă, rămân un șir de fenomene de investigat și, prin urmare, implicarea detaliată a compartimentului interstițial în mediul metabolic specific CSS nu este complet elucidată. Morfofuncționalitatea nișei CSS actualmente mai este în dezbateră [23, 4]. CSS sunt dispersate printre spermatogoniile diferențiate [32, 39] într-un model de nișă deschisă, dar nu într-o nișă închisă, ca și majoritatea celulelor stem din organism, unde factorii de reglementare sunt, relativ, ușor de definit și explicat [32]. Spre deosebire de alte tipuri de celule stem, metabolismul CSS, modificările metabolice la diferențierea spermatogonială și funcționalitatea fiziologică a acestor celule rămâne puțin studiată. CSS se caracterizează prin capacitatea lor de auto-reînnoire, sub influența factorilor externi și interni cu asigurarea adaptării rapide și menținerii funcției tisulare, care necesită un grad ridicat de plasticitate metabolică în țesutul testicular [18, 37]. Testiculele sunt organe lipsite de oxigen [37], iar CSS se află departe de la vasele sangvine, într-o nișă hipoxică [4, 23], sau populațiile de spermatogonii nediferențiate se află în apropierea sistemului vascular [39]. CSS și spermatogoniile nediferențiate sunt situate adiacent laminei bazale a tubului seminifer în diferite stări transcripționale în funcție de dezvoltarea lor [11, 14]. Deși, investigațiile privind relațiile dintre metabolism și starea CSS au fost mult mai puțin extinse, cercetările funcționale au predeterminat, că CSS, la fel, ca și mulți dintre omologii multipotenți ale acestora și celulele stem pluripotente, nu numai că realizează metabolismul glicolitic, dar și îl utilizează pentru menținerea pe termen lung a capacității de regenerare. Totodată, potrivit cercetărilor, spermatogoniile nediferențiate metabolizează predominant glucoza derivată din fluxul sangvin prin glicoliză, dar nu prin respirația mitocondrială [1], dar, în același timp, studii de flux metabolic, adică analiza aprofundată a consumului preferențial de metaboliți ai CSS nu a fost de găsit. Cu toate acestea, glicoliză în aceste celule a fost confirmată prin analiza de secvențiere a ARN-ului și tranziție în fosforilarea oxidativă cu diferențiere în nișa vasculară a CSS. Această tranziție către

nișa vasculară ar putea fi asociată cu o mișcare de-a lungul lanțului de diferențiere, produsă de micromediile metabolice, inclusiv oxigen, care servește ca un declanșator inițial al modificărilor fluxului metabolic [1, 12, 36]. În primul rând, în cercetările de prelungire a funcționalității CSS s-a stabilit, că implicarea spermatogoniilor nediferențiate în stare glicolitică, prin scăderea presiunii oxigenului a crescut semnificativ numărul CSS și a prelungit capacitatea CSS de a genera cicluri puternice de spermatogeneză [13]. În mod similar, s-a demonstrat, că stimularea ciclului glicolitic a produs o auto-reînnoire crescută a CSS, iar inhibarea acestuia a stabilit scăderea glicolizei și creșterea respirației mitocondriale, provocând devieri de la auto-reînnoire, inclusiv și inhibarea chimică a glicolizei a afectat în mod similar capacitatea de auto-reînnoire a CSS [17]. Cumulativ, aceste studii arată, că CSS nu numai că utilizează preferabil glicoliza, dar și că pot să apără schimbări ale metabolismului oxidativ la tranziția de diferențiere [17]. Alte cercetări au confirmat aceste constatări, sugerând că tranziția de diferențiere este, într-adevăr, asociată cu reglarea funcției mitocondriale epuizate în linia germinativă, care a dus la dereglarea spermatogenezei, cu reducerea numărului de spermatogonii diferențiate, dar fără efect nociv aparent asupra spermatogoniilor nediferențiate [35]. Funcția mitocondrială optimă și metabolismul aerob în compartimentul celular este asigurat de constitutivitatea modificărilor mitocondriale cu facilitarea răspândirii metabolitilor, minimizarea heteroplasmei și repararea deteriorărilor mitocondriale, în timp ce, deficitul de mitofusină poate duce la fragmentarea mitocondrială, scăderea expresiei complexelor lanțului respirator și capacitatea redusă pentru celulele liniei spermatogene [35]. Acest fenomen a stabilit, că spre deosebire de CSS participante în glicoliză, diferențierea spermatogoniilor, pentru ași păstra funcționalitatea, evoluează prin creșterea mitocondrială și trecerea la metabolismul oxidativ. Simultan, este de remarcat faptul, că un neajuns al informației accesibile este, că efectele dereglării descrise a fuziunii mitocondriale nu au putut fi evaluate cu siguranță în funcționarea CSS cu auto-reînnoire. Totodată, s-a menționat experimental, că procesul de pregătire a fuziunii mitocondriale poate începe în urma tranziției CSS la progenitor, pentru a sprijini diferențierea spermatogonială [13]. Alte dovezi, referitor la rolul integral al mitocondriilor în facilitarea tranziției diferențiate în spermatogonii nu au fost capabile să susțină diferențierea și regenerarea ulterioară a spermatogenezei, cu ipoteza de reținere a trecerii metabolice de la glicoliză la fosforilarea oxidativă, făcând

imposibilă capacitatea spermatogoniilor la diferențiere [17]. Concomitent, există dovezi indirecte, privind prezența mitocondriilor imature în CSS, bazate pe glicoliză, deși procesul de creștere mitocondrială începe la progenitori prin fosforilarea oxidativă la diferențiere, modificări ale morfologiei mitocondriale, consumul de oxigen și producția de lactat în spermatogonii. În plus, nu este cunoscut nici faptul, dacă aceste preferințe metabolice sunt asociate cu intensitatea diferențială de oxigen în micromediul înconjurător al spermatogoniilor din testicul, așa cum este cazul altor tipuri de celule stem. Astfel, prin abordările menționate, ne-am străduit să ne îmbunătățim cunoștințele în domeniul metabolismului CSS. Îmbunătățirea înțelegerii rolului fiziologiei și metabolismului în reglarea funcționalității CSS reprezintă un progres important în domeniul biologiei celulelor germinale masculine, menținerii biodiversității viului și combaterii infertilității. Mai mult, CSS adulte se află într-o nișă fiziologică, determinată de funcția celulelor Sertoli adulte [15, 19, 28], într-un compartiment mic și strâns controlat la membrana bazală, înconjurat de celule complexe de nișă și controlat prin difuzie paracelulară prin diferite complexe joncționale intercelulare. Celulele Sertoli adulte formează un sistem de nișă polarizat metabolic și imunologic. Fluxul metabolic celular este sensibil la fluctuațiile disponibilității substratului și presiunii parțiale a oxigenului și prin modificări celulare poate influența disponibilitățile metabolitelor. Menținerea stărilor metabolice distincte sunt esențiale pentru spermatogeneză, dezvoltarea celulelor stem ale liniei germinale [12, 33, 36], menținerea CSS [13, 17], diferențiere [5] și, prin urmare, pentru fertilitatea masculină.

Concluzii și perspective

Progresele în studiul originilor, reglementării și activității CSS au pus bazele cercetării opțiunilor biologice, fiziologice și metabolice ale CSS. În prezenta lucrare am încercat să revizuim stadiul actual de cercetare în fiziologia și biologia CSS, precum și reglarea lor moleculară, necesare pentru investigații fundamentale și posibile aplicații practice. Mecanismele și caracteristicile exacte ale evenimentelor de maturare testiculară și tranziția gonocitelor la CSS prin activarea căilor specifice ale CSS sau stabilirea embrionară timpurie a profilului transcripțional a spermatogoniilor neonatale și prepuberale nu sunt definitiv elucidate. În această ordine de idei, întrucât metabolismul precursorilor CSS sau gonocitele nu a fost investigat multilateral și caracteristicile maturizării

acestora sunt încă în dezbateri, momentul exact al timpului și amprenta metabolică a stadiilor distincte de dezvoltare a celulelor germinale rămân de elucidat în continuare. Gonocitele, care se bazează potențial pe un metabolism diferit față de celulele adulte necesită anumit timp pentru maturarea fiziologică în condițiile de nișă, care duce la asigurarea integrității CSS și modului în care metabolismul CSS este stabilit și protejat în cadrul nișei, ceea ce este foarte important în continuitatea investigațiilor acestui micromediu.

Alt moment de perspectivă sunt funcționalitatea mitocondriilor și disfuncțiile lor în menținerea integrității CSS, care cu siguranță reprezintă o provocare complexă ce necesită cercetări suplimentare. În ghidarea acestor studii, va fi în mod clar avantajos să se ia în considerare cerințele metabolice ale mitocondriilor și să se exploreze strategii prin care să se mențină integritatea acestora. Disfuncțiile și mutațiile mitocondriale au un rol deosebit în metabolismul și reglarea activităților spermatogoniale, legate de infertilitatea masculină, iar deteriorările mitocondriilor pot duce la oprirea completă a spermatogenezei în dependență de defectul specific. Prin urmare, opiniile reviuului referitor la creșterea mitocondrială și trecerea la metabolismul oxidativ necesar pentru diferențierea spermatogoniilor va putea explica circumstanțele în care deteriorările funcției fiziologice a mitocondriilor pot duce la infertilitate asociată cu oprirea în acest stadiu de dezvoltare. Mai mult, sunt necesare cercetări pentru a înțelege în detaliu modul în care modificările structurale și metabolice influențează evenimentele din nișa fiziologică și maturarea metabolică ulterioară a CSS în timpul dezvoltării.

În același timp, CSS la toate etapele metabolice și fiziologice, necesită o manipulare eficientă pentru cea mai bună conservare și extindere funcțională a lor în beneficiul reproducției prin optimizarea tehnicilor de aplicare. Țesuturile testiculare sau suspensiile de celule testiculare, care conțin CSS, în perspectivă, pot fi supuse și procesului de crioconservare și pot servi ca o alternativă în conservarea biodiversității. Așadar, cercetările de perspectivă referitor la aplicarea în viitor a CSS conservate, paralel cu tehnicile de reproducere alternative aplicabile animalelor vor contribui la combaterea infertilității masculine, la menținerea speciilor pe cale de dispariție în biodiversitatea viului și la accelerarea progresului creșterii și exploatării animalelor domestice valoroase.

Bibliografie

1. *Boussouar F., Benahmed M.* Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol Metab.* 2004, 15(7), 345-350.
2. *Braun R.E. et al.* Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature* 337, 1989. 373-376.
3. *Carrieri C. et al.* A transit-amplifying population underpins the efficient regenerative capacity of the testis. *Journal of Experimental Medicine.* 2017, 214, 1631-1641.
4. *Chan F. et al.* Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes. *Genes Dev.* 2014, 28, 1351-1362.
5. *Chen S.R. et al.* Disruption of Genital Ridge Development Causes Aberrant Primordial Germ Cell Proliferation but Does Not Affect Their Directional Migration. *BMC Biol.* 2013, 11-22.
6. *Clermont Y. & Hermo L.* Spermatogonial stem cells in the albino rat. *Am. J. Anat.* 1975, 142, 159-175.
7. *Culty M.* Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Def Res Part C Embryo Today.* 2009, 87, 1-26.
8. *Dadoune J.P.* New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007, 45, 141-147.
9. *De Rooij D.G.* Proliferation and Differentiation of Spermatogonial Stem Cells. *Reproduction.* 2001, 121(3), 347-354.
10. *Griswold M.D.* The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1998, 9, 411-416.
11. *Guo J. et al.* The adult human testis transcriptional cell atlas. *Cell Res.* 2018, 28, 1141-1157.
12. *Hayashi Y. et al.* Distinct requirements for energy metabolism in mouse primordial germ cells and their reprogramming to embryonic germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017, 114(31), 8289-8294.
13. *Helsel A.R.* Glycolysis-optimized conditions enhance maintenance of regenerative integrity in mouse spermatogonial stem cells during long-term culture. *Stem Cell Reports.* 2017, 8(5), 1430-1441.
14. *Hermann B.P. et al.* The mammalian spermatogenesis single-cell transcriptome, from spermatogonial stem cells to spermatids. *Cell Rep.* 2018, 25(6), 1650-1667.
15. *Hofmann M-C.* Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol.* 2008, 288(1-2), 95-103.
16. *Huckins C.* The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 1971, 169, 533-557.
17. *Kanatsu-Shinohara M. et al.* Aging of spermatogonial stem cells by Jnk-mediated glycolysis activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019, 116, 16404-16409.

18. *Krisher R.L., Prather, R.S.* A Role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Mol. Reprod. Dev.* 2012, 79, 311-320.
19. *Kubota H., Brinster R.L.* Spermatogonial stem cells. *Biol Reprod.* 2018, 99(1), 52-74.
20. *La H.M. & Hobbs R.M.* Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. *Cell Mol. Life Sci.* 2019, 76, 4071-4102.
21. *Larose H. et al.* Gametogenesis: A Journey from Inception to Conception. *Curr Top Dev Biol.* 2019, 132, 257-310.
22. *Lok D. et al.* Morphology, proliferation, and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the Chinese hamster and the ram. *Anat. Rec.* 1982, 203, 83-99.
23. *Lord T., Nixon B.* Metabolic changes accompanying spermatogonial stem cell differentiation. *Dev Cell.* 2020, 52(4), 399-411.
24. *Ma F. et al.* Cyclin A2 Is Essential for Mouse Gonocyte Maturation. *Cell Cycle.* 2020, 19, 1654-1664.
25. *Meng X. et al.* Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* 2000, 287, 1489-1493.
26. *Murray SM. et al.* Germ Cell Sex Determination: A Collaboration Between Soma and Germline. *Curr Opin Cell Biol.* 2010, 22, 722-729.
27. *Oakberg E.F.* Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.* 1971, 169, 515-531.
28. *Oatley J.M., Brinster R.L.* The Germline Stem Cell Niche Unit in Mammalian Testes. *Physiol Rev.* 2012, 92, 577-595.
29. *Ogawa T., Ohmura M., Ohbo K.* The Niche for Spermatogonial Stem Cells in the Mammalian Testis. *Intl J Hematol.* 2005, 82, 381-388.
30. *ReChen L.Y., Brown P.R., Willis W.B., Eddy E.M.* Peritubular Myoid Cells Participate in Male Mouse Spermatogonial Stem Cell Maintenance. *Endocrinology.* 2014, 155, 4964-4974.
31. *Sasaki K. et al.* The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys is Specified in the Nascent Amnion. *Dev Cell.* 2016, 39, 169-185.
32. *Stine R.R., Matunis E.L.* Stem cell competition: Finding balance in the niche. *Trends Cell Biol.* 2013, 23, 357-364.
33. *Tischler J. et al.* Metabolic regulation of pluripotency and germ cell fate through α -ketoglutarate. *EMBO J.* 2019, 38(1), e99518.
34. *Urdike D.L.* Quelling Germ Cell Pluripotency on the Genital Ridge. *Proc Natl Acad Sci.* 2019, 116, 25374-25375.
35. *Varuzhanyan G. et al.* Mitochondrial fusion is required for spermatogonial differentiation and meiosis. *Elife.* 2019, 8, 1-27.
36. *Verdikt R., Allard P.* Metabolo-epigenetics: the interplay of metabolism and epigenetics during early germ cells development. *Biol Reprod.* 2021, 105(3), 616-624.

37. *Wenger R.H., Katschinski M.* The hypoxic testis and post-meiotic expression of PAS domain proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2005, 16(4-5), 547-553.
38. *Ying Y. et al.* Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001, 98, 7858-7862.
39. *Yoshida S. et al.* A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science.* 2007, 317, 1722-1726.
40. *Zaker H. et al.* Boosting Effect of Testosterone on GDNF Expression in Sertoli Cell Line (TM4): Comparison Between TM3 Cells-Produced and Exogenous Testosterone. *Gene.* 2022, 812, 146112.